

**(19) Japan Patent Office (JP)**

**(12) Publication of Patent Application (A)**

**(11) Publication Number of Patent Application: 1-260364**

**(43) Date of Publication of Application: October 17, 1989**

**(51) Int. Cl.<sup>4</sup> Id. No. Intraoffice Ref. No.**

**G01N 33/573**

**A-7906-2G**

**33/577**

**B-7906-2G**

**Request for Examination: not made**

**Number of Claims: 9 (total 4 pages)**

**(54) Title of the Invention:**

**Immunological measuring method for sugar transferase activity**

## **SPECIFICATION**

### **1. [Title of the Invention]**

**Immunological measuring method for sugar transferase activity**

### **2. [Claims]**

**(1) An immunological measuring method for sugar transferase activity in a specimen characterized by reacting a solid-phase acceptor complex carbohydrate, formed by combining an acceptor complex carbohydrate with an insoluble carrier, with a specimen which is assumed to contain a sugar transferase to be measured and a sugar constituting a substrate of the sugar transferase, thereby generating a sugar chain specific to the sugar transferase on the insoluble carrier by a function of the sugar transferase in the specimen, then reacting a marked antibody formed by marking a monoclonal antibody to the generated sugar chain**

structure with a marker, and measuring an activity of the marker of the marked antibody coupled on the insoluble carrier.

(2) A method according to claim 1, wherein the acceptor complex carbohydrate is a glycolipid or a glycoprotein.

(3) A method according to claim 1, wherein the sugar transferase to be measured is galactosyl transferase.

(4) A method according to claim 3, wherein the sugar transferase to be measured is  $\beta$ 1-4 galactosyl transferase.

(5) A method according to claim 4, wherein the monoclonal antibody is an antibody capable of recognizing paraglobocid.

(6) A method according to claim 1, wherein the sugar transferase to be measured is sialyl transferase.

(7) A method according to claim 1, wherein the sugar transferase to be measured is  $\alpha$ 2-6 sialyl transferase.

(8) A method according to claim 7, wherein the monoclonal antibody is an antibody capable of recognizing  $\alpha$ 2-6 sialyl paraglobocid.

(9) A method according to claim 1, 5 or 8, wherein the marker is a radio isotope, an enzyme, a fluorescent substance or a chemiluminescent substance.

### **3. [Detailed Description of the Invention]**

The present invention relates to a method for immunologically measuring a sugar transferase activity, and more specifically a method for measuring a sugar transferase activity in a specimen, utilizing a monoclonal antibody capable of recognizing a sugar chain generated by a function of a sugar transferase in the specimen.

Recently, a relation between a carcinogenesis of a cell and a change in a

sugar chain structure on the surface of the cell is attracting attention, and also presence of a sugar transferase activity inducing such sugar chain structure is also attracting attention in relation with the carcinogenesis of the cell. Many attempts to measure the sugar transferase activity in the blood of cancer patient for diagnosing cancer have already been made, and an activity higher than in a normal person is already reported. However the prior measuring method for the sugar transferase activity merely measures an intake amount of a marked toner sugar into an acceptor complex carbohydrate as the activity of the sugar transferase, and is incapable of measuring a specific enzyme, dependent on a sugar chain bonding type featuring the sugar transferase, namely an isozyme of the sugar transferase. Also there is reported presence of a sugar chain antigen expressed specifically in a tumor tissue or a preparation of a monoclonal antibody therefor, but there are cases where such sugar chain antigen is not liberated in the blood or an autoantibody is present, so that an increase of the antigen in a tissue is not necessarily reflected in a serum diagnosis for the antigen.

An object of the present invention is to measure an activity of a sugar transferase specific to a cancer on a specimen of a body fluid such as blood, for application to a cancer diagnosis, but the object of measurement is not limited to a cancer-specific sugar transferase and the principle of the present invention is applicable to the measurement of any sugar transferase. More specifically, the present invention is to measure an activity of a sugar transferase in a specimen, by reacting a solid-phase acceptor complex carbohydrate, formed by combining an acceptor complex carbohydrate with an insoluble carrier, with a specimen liquid such as blood and a donor sugar, thereby combining the donor sugar on the

solid-phase acceptor complex carbohydrate by a catalytic function of the sugar transferase in the specimen liquid, then reacting a marked antibody formed by marking a monoclonal antibody capable of recognizing the generated sugar chain structure with a marker, and measuring an activity of the marker of the marked antibody coupled on the insoluble carrier across the generated sugar chain.

The prior measuring method for the sugar transferase activity is to measure an intake amount of a marked donor sugar into an acceptor complex carbohydrate, and is incapable of distinguishing specificity of the enzyme on the sugar chain bonding type featuring the sugar transferase, for example distinguishing enzymes respectively catalyzing  $\text{Ga}\beta 1\text{-4GlcNAc}$  and  $\text{Ga}\beta 1\text{-3GlcNAc}$  bonds. Also the prior method, not utilizing a solid-phase acceptor complex carbohydrate, involves a cumbersome separation of the marked donor sugar and the product, and is associated with a drawback that glycolipid and glycoprotein are measured by respective specific methods. The present invention has advantages that the specificity of the enzyme on the sugar chain bonding type can be distinguished, that, as long as the generated sugar chain is an epitope recognizable by a monoclonal antibody, a glycolipid and a glycoprotein can be measured by this method, and that the operations are very simple. Also even in a case where the sugar chain antigen itself cannot be detected such as a sugar chain generated in excess by carcinogenesis but not liberated in the blood or a sugar chain having a short half-period in the blood, the present invention, capable of measuring the sugar transferase involved in the sugar chain antigen, has an advantage of being usable as cancer diagnosis.

The sugar transferase to be measured can be for example galactosyl transferase or sialyl transferase. In particular,  $\beta 1\text{-4}$  galactosyl transferase and

$\alpha$ 2-6 sialyl transferase are considered useful for cancer diagnosis.

The insoluble carrier can be a carrier substance ordinarily employed in a solid-phase reaction, for example a synthetic polymer substance such as silicone, polyacrylamide, polystyrene, or cephadex, a natural polymer such as cellulose, ceramics, a glass or a metal. Such substance is surface treated by a known technology and a complex carbohydrate serving as an acceptor is coupled.

The marker can be an enzyme, a radio isotope, or a fluorescent substance.

In the following, the present invention will be explained in more details by examples.

**Example 1: measurement of  $\beta$ 1-4 galactosyl transferase activity**

**1) Solidification of amino CTH (lactotriaosylceramide) to polystyrene beads**

500 polystyrene beads (0.6 cm in diameter) were treated with ethanol, then added to 100 ml of an amino CTH solution (2  $\mu$ g/bead), and were reacted for 20 hours at the room temperature under agitation. The solution was removed, and 100 ml of a phosphate buffer (pH 7.5) containing horse serum by 5% were added, and reacted for 1 hour at the room temperature under agitation. After the solution was removed, a washing with a phosphate buffer was conducted 5 times to obtain amino CTH adsorbed beads.

**2) Preparation of antiparaglobocid monoclonal antibody**

An emulsion was prepared by adding 0.1 ml of Freund complete adjuvant to 0.1 ml of a paraglobocid solution (containing 25  $\mu$ g). 0.2 ml of the emulsion were intraperitoneally administered to a Balb/c mouse four times with an interval of 2 weeks. A final immunization was executed 10 days later, and pancreas was taken out 3 days later.  $1 \times 10^8$  pancreas cells and  $2 \times 10^7$  myeloma cells (P3U1 strain) derived from Balb/c mouse were subjected to a cell fusion, in the presence

of polyethylene glycol by 50%. A selective cloning of specific monoclonal antibody producing bacteria was conducted by an enzyme immunoassay method on a plate on which paraglobocid was adsorbed.  $1 \times 10^7$  cells of the obtained monoclonal antibody producing strain were intraperitoneally inoculated in a Balb/c mouse subjected to an administration of blistan, and peritoneal liquid was sampled 2 weeks later.

### 3) Marking of antiparaglobocid monoclonal antibody with $^{125}\text{I}$

In peritoneal liquid containing an antiparaglobocid monoclonal antibody, ammonium sulfate powder was dissolved to saturation at 40%. The precipitating crystals were recovered by centrifuging, and dissolved in a phosphate buffer (pH 7.5) at 1 mg/ml to obtain a  $\gamma$ -globulin solution.

About 300  $\mu\text{Ci}$  of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  were added to a phosphate buffer (pH 7.5), then 1 ml of the aforementioned  $\gamma$ -globulin solution was added and agitated, further 25  $\mu\text{l}$  of chloramine-T (1 mg/ml) were added and reacted for 30 seconds under shaking, and 100  $\mu\text{l}$  of sodium metabisulfite (1 mg/ml) were added to terminate the reaction. Free  $^{125}\text{I}$  was eliminated with a cephacryl S-300 column and  $^{125}\text{I}$ -marked paraglobocid monoclonal antibody was recovered.

### 4) Measurement of $\beta$ 1-4 galactosyl transferase activity

To 10  $\mu\text{l}$  of a tested serum, a bead with solid-phase amino CTH, 100  $\mu\text{l}$  of a UDP-Gal (uridine diphosphate galactose) solution and 90  $\mu\text{l}$  of a 1 mM sodium cacodylate buffer [pH 6.5, containing  $\text{MnCl}_2$  (10  $\mu\text{mol}$ ), Triton X-100 (0.5%)] were added and incubated for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . After the bead was washed twice with a physiological saline solution, 200  $\mu\text{l}$  of  $^{125}\text{I}$ -marked  $\alpha$ 2-6 sialyl paraglobocid monoclonal antibody solution were added, and an incubation was conducted for 4 hours under shaking at the room temperature. After the bead was washed three

times with a physiological saline solution, a radioactivity of the bead was measured.

An  $\alpha$ 2-5 sialyl transferase activity in the tested serum was determined from a standard curve prepared in advance.

#### **4. [Brief Description of the Drawings]**

Fig. 1 shows an example of a standard curve in case a  $\beta$ 1-4 galactosyl transferase activity in blood is measured by the present invention.

Fig. 2 shows values of  $\beta$ 1-4 galactosyl transferase activity in a healthy person and patients of various diseases measured by the present invention.

**Patent applicant: Dynabott Co.**

**Agent: Attorney Takehiko Saito**

**Agent: Attorney Ryoji Kawase**

## DRAWINGS

Fig. 1

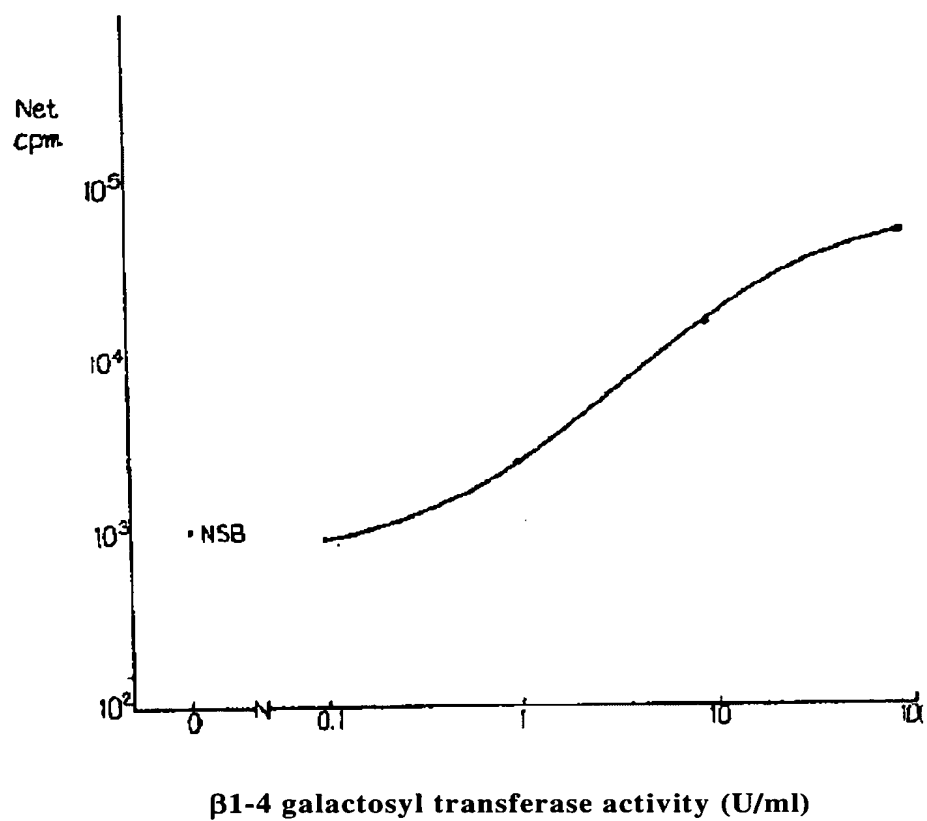
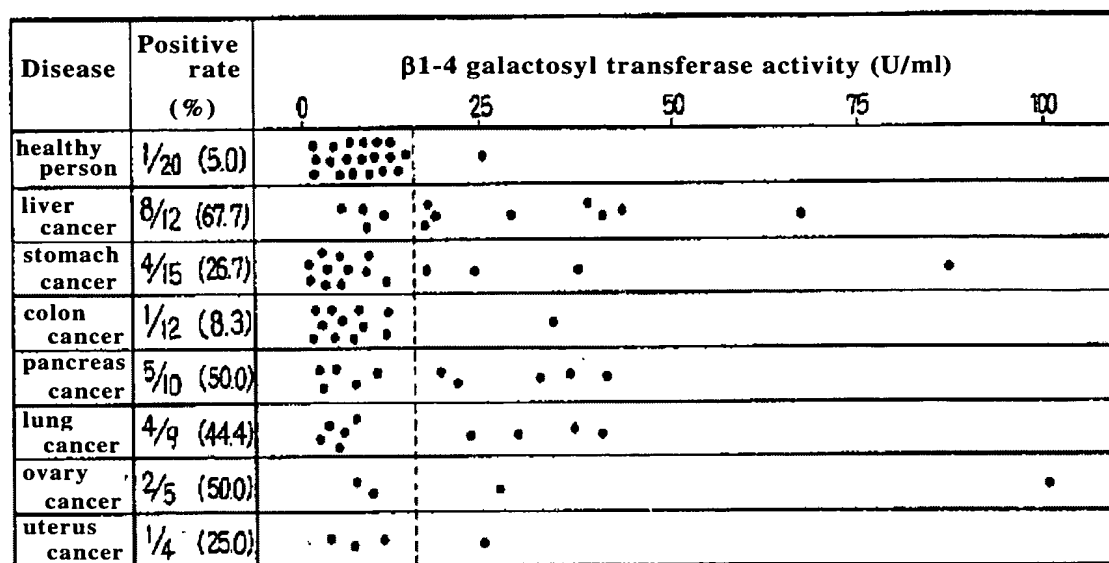




Fig. 2



## **AMENDMENT**

**December 6, 1988**

**Attn: Commissioner of Patent Office**

**Mr. Fumiaki Yoshida**

### **1. Indication of Case**

**1988 Patent Application No.88257**

### **2. Title of the Invention**

**Immunological measuring method for sugar transferase activity**

### **3. Ammendant**

**Relation to the Case: Patent Applicant**

**Appellation: Dynabott Co.**

### **4. Agent**

**Address: Akasaka Taisei Bldg., 1-18 Akasaka 1-chome,**

**Minato-ku, Tokyo 107 (Telephone Number: 582-7161)**

**Name: Attorney (7175) Takehiko Saito**

### **5. Object of Amendment**

**Specification, Detailed Description of the Invention**

### **6. Content of Amendment**

**(1) Following sentences are inserted in Specification, page 8, between line 2 and line 3:**

**“A  $\beta$ 1-4 galactosyl transferase activity in the tested serum was determined from a standard curve prepared in advance.**

**Example 2: Measurement of  $\alpha$ 2-6 sialyl transferase activity**

**To 10  $\mu$ l of a tested serum, a bead with adsorbed paraglobocid (2  $\mu$ g/bead), 100  $\mu$ l of a CMP-NeuAc (cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminate)**

solution and 90  $\mu$ l of a 1 mM sodium cacodylate buffer [pH 6.5, containing Triton X-100 (0.5%)] were added and incubated for 1 hour at 37°C. After the bead was washed twice with a physiological saline solution, 200  $\mu$ l of  $^{125}$ I-marked  $\alpha$ 2-6 sialyl paraloglobocid monoclonal antibody solution were added, and an incubation was conducted for 4 hours under shaking at the room temperature. After the bead was washed three times with a physiological saline solution, a radioactivity of the bead was measured.”

**INDICATION OF CORRECTION ACCORDING TO STIPULATION OF  
PATENT LAW, ARTICLE 17.2**

On 1988 patent application No. 88257 (JP-A-1-269364, described on JP-A-1-2604, published October 17, 1989), there was an amendment according to stipulation of Patent Law, Article 17.2, which is shown in the following: 6(1)

Int. Cl. <sup>5</sup>		Id. No.	Intraoffice Ref. No.
G01N	33/573		A-7906-2G
	33/577		B-7906-2G

**AMENDMENT**

**January 17, 1990**

**Attn: Commissioner of Patent Office**

**Mr. Fumiaki Yoshida**

**1. Indication of Case**

**1988 Patent Application No.88257**

**2. Title of the Invention**

**Immunological measuring method for sugar transferase activity**

**3. Ammendant**

**Relation to the Case: Patent Applicant**

**Appellation: Dynabott Co.**

**4. Agent**

**Address: Akasaka Taisei Bldg., 1-18 Akasaka 1-chome,**

**Minato-ku, Tokyo 107 (Telephone Number: 582-7161)**

**Name: Attorney (7175) Takehiko Saito**

**5. Object of Amendment**

**Specification, Detailed Description of the Invention**

**6. Content of Amendment**

**(1) Specification Page 7, line 2 from the bottom:**

**Delete "α2-6 sialyl".**

⑩ 日本国特許庁(JP)

訂正有り  
⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-260364

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

G 01 N 33/573  
33/577

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G  
B-7906-2G

⑭ 公開 平成1年(1989)10月17日

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全4頁)

⑮ 発明の名称 糖転移酵素活性の免疫学的測定方法

⑯ 特 願 昭63-88257

⑰ 出 願 昭63(1988)4月12日

⑱ 発 明 者	滝 孝 雄	静岡県静岡市森下町3-2
⑱ 発 明 者	茗 荷 昭 男	神奈川県横浜市緑区上山町491-26
⑱ 発 明 者	今 井 敏 彦	東京都江戸川区清新町1-1-36-403
⑱ 発 明 者	長 尾 邦 宏	東京都足立区綾瀬1-34-7-1309
⑲ 出 願 人	ダイナボット株式会社	東京都港区虎ノ門3-8-21 第33森ビル
⑲ 代 理 人	弁理士 齊藤 武彦	外1名

明 細 書

1. 【発明の名称】

糖転移酵素活性の免疫学的測定方法

2. 【特許請求の範囲】

- (1) 不溶性担体にアクセプター複合糖質を結合させた固相化アクセプター複合糖質に、測定すべき糖転移酵素を含有すると思われる検体及び該糖転移酵素の基質となる糖を反応させ、検体中の糖転移酵素の働きにより不溶性担体上に該糖転移酵素に特異的な糖鎖を生成させた後、生成された糖鎖構造に対するモノクローナル抗体を標識剤で標識した標識抗体を反応させ、次いで、不溶性担体上に結合した標識抗体の標識剤の活性を測定することを特徴とする検体中の糖転移酵素活性の測定方法。
- (2) アクセプター複合糖質が糖蛋白或いは糖脂質である特許請求の範囲第1項に記載の方法。
- (3) 測定すべき糖転移酵素がガラクトシルトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項に記載の方法。
- (4) 測定すべき糖転移酵素がβ1-4ガラクトシルトランスフェラーゼである特許請求の範囲第3項に記載の方法。
- (5) モノクローナル抗体がパラグロボシドを認識する抗体で

ある特許請求の範囲第4項に記載の方法。

- (6) 測定すべき糖転移酵素がシアリルトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項に記載の方法。
- (7) 測定すべき糖転移酵素がα2-6シアリルトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項に記載の方法。
- (8) モノクローナル抗体がα2-6シアリルパラグロボシドを認識する抗体である特許請求の範囲第7項に記載の方法。
- (9) 標識剤がラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質或いは化学発光物質である特許請求の範囲第1項、第5項或いは第8項に記載の方法。

3. 【発明の詳細な説明】

本発明は、糖転移酵素活性を免疫学的に測定する方法に関するものであり、より詳しくは、検体中の糖転移酵素の働きにより生成される糖鎖を認識するモノクローナル抗体を用いて、検体中の糖転移酵素活性を測定する方法に関するものである。

近年、細胞の癌化と該細胞表面上の糖鎖構造の変化との関係が注目を集めており、さらにその糖鎖構造の変化を引き起こす糖転移酵素活性の存在も細胞の癌化と関連して話題を集めてきている。すなわち、癌患者血中における糖転移酵素活

性を測定し、癌診断に利用しようという試みは多くなされており、健康人より有意に高い活性を有するという報告もなされている。しかし、従来の糖転移酵素活性の測定法は、標識ドナー糖のアクセプター複合糖質への取り込み量を測定することにより糖転移酵素の活性測定としているにすぎず、糖転移酵素のひとつの特徴である糖鎖結合様式に依存した特異的酵素、すなわち、糖転移酵素のアイソザイムを区別してその活性を測定することはできなかった。また、腫瘍組織に特異的に発現する糖鎖抗原の存在や、それに対するモノクローナル抗体の作製に関する報告もなされているが、その糖鎖抗原が血中に遊離しない場合や、自己抗体が存在する場合などもあり、組織での抗原の増量が必ずしもその抗原の血清診断に反映されるとは限らない。

本発明は、血液などの体液を検体として、癌に特異的な糖転移酵素の活性測定し、癌の診断に用いることを一つの目的としているが、その測定対象は癌特異的な糖転移酵素に限定されるものではなく、あらゆる糖転移酵素の測定に、本発明の原理を利用することができるものである。すなわち、本発明は、アクセプターとなる複合糖質を不溶性担体に結合させた固相化アクセプター複合糖質に、血液などの検体液およびド

ナー糖を反応させ、検体液中の糖転移酵素の触媒作用により固相化アクセプター複合糖質にドナー糖を結合させ、次いで生成された糖鎖構造を認識するモノクローナル抗体を標識剤で標識した標識抗体を反応させ、不溶性担体に生成糖鎖を介して結合した標識抗体の標識剤の活性を測定することにより、検体中の糖転移酵素の活性を測定するものである。

従来の糖転移酵素活性の測定法は、標識ドナー糖をアクセプター複合糖質への取り込み量を測定するものであり、糖転移酵素の一つの特徴である糖鎖結合様式に関する酵素の特異性の区別、例えば、Gal $\beta$ 1-4GlcNAcとGal $\beta$ 1-3GlcNAc結合の各々を触媒する酵素の区別ができなかった。さらに、従来の方法では、固相化したアクセプター複合糖質を用いないため、標識したドナー糖と生成物の分離が煩雑であり、また、糖脂質と糖蛋白ではそれぞれ固有の方法により測定が行われていた等の短所があった。本発明は、糖鎖結合様式に関する酵素の特異性を区別できること、生成糖鎖がモノクローナル抗体によって認識されるエピトープであれば、糖脂質も糖蛋白もいずれもこの方法で測定することができること、操作が非常に簡便であるなどの利点を有する。さらに、癌化により過剰に産生されても血中に遊離されない糖鎖、もしくは血中半減

期の短い糖鎖など、糖鎖抗原自体を検出できない場合においても、本発明によれば、糖鎖抗原に関与する糖転移酵素を測定するため、癌の診断に用いることができるという利点を有する。

測定される糖転移酵素としては、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼなどを挙げることができる。特に $\beta$ 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ 2-6シアリルトランスフェラーゼは、癌の診断に有用であると考えられる。

不溶性担体としては、固相反応において通常利用される担体物質を用いることができ、例えば、シリコーン、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、セファデックス等の合成高分子物質、セルロース等の天然高分子、セラミックス、ガラス、金属等が挙げられる。これらを公知技術で表面処理し、アクセプターとなる複合糖質を結合させる。

標識剤としては、酵素類、ラジオアイソトープ、蛍光物質などを用いることができる。

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1  $\beta$ 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の測定

1) アミノCTH (Lactotriaoacylceramide) のポリスチレン

#### ビーズへの固相化

ポリスチレンビーズ (0.6mm径) 500個をエタノール処理した後、アミノCTH溶液 (2 $\mu$ g/ビーズ) 100mlに加え、室温で20時間、攪拌しながら反応させた。溶液を除去し、5%の馬血清を含有するリン酸緩衝液 (pH7.5) 100mlを加え、室温で1時間、攪拌しながら反応させた。溶液を除去後、リン酸緩衝液にて5回洗浄し、アミノCTH吸着ビーズを作製した。

#### 2) 抗パラグロボシドモノクローナル抗体の作製

パラグロボシド溶液0.1ml (25 $\mu$ g含有) にフロインド・コンプリート・アジュバント0.1mlを加え、エマルジョンを調製した。このエマルジョン0.2mlをBalb/cマウスの腹腔に2週間おきに4回投与した。10日後に最終免疫を行い、その3日後に脾臓を摘出した。脾細胞 $1 \times 10^6$ 個と、Balb/cマウス由来ミエローマ細胞 (P801株)  $2 \times 10^7$ 個をポリエチレングリコール50%存在下で細胞融合を行わせた。特異的なモノクローナル抗体産生細胞の選択クローン化は、パラグロボシドを吸着したプレート上でエンザイムイムノアッセイ法により行った。得られたモノクローナル抗体産生株 $1 \times 10^7$ 個を予めプリスタンを投与したBalb/cマウスの腹腔に接種し、2

週間後に腹水を採取した。

### 3) 抗パラグロボシドモノクローナル抗体の<sup>125</sup>Iによる標識

抗パラグロボシドモノクローナル抗体含有腹水に硫酸アンモニウム粉末を40%飽和となるように添加溶解した。析出した沈澱を遠心分離して回収後、リン酸緩衝液(pH7.5)に1mg/mlとなるように溶解してγ-グロブリン液を得た。

Na<sup>125</sup>I約300μCiをリン酸緩衝液(pH7.5)に加え、上記γ-グロブリン液1mlを加えて攪拌後、クロラミンT(1mg/ml)25μlを添加、30秒間振盪反応後、メタ重亜硫酸ナトリウム(1mg/ml)100μl加入反応を停止させた。遊離の<sup>125</sup>IをセファクリルS-300カラムを用いて除去し、<sup>125</sup>I標識抗パラグロボシドモノクローナル抗体を回収した。

### 4) β1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の測定

被検血清10μlに固相化アミノCTHビーズ1個、UDP-Gal(ウリジンジフォスフェイトガラクトース)液100μl及び1mMコシル酸ナトリウム緩衝液(pH8.5, MnCl<sub>2</sub> (10μmol), Triton X-100 (0.5%)を含む)80μlを加え、37℃で1時間インキュベーションした。生理食塩水でビーズを2回洗浄後、<sup>125</sup>I標識抗α2-6シアリルパラグロボシドモノクローナル抗体液200μlを加え、室温で振盪しながら4時間インキ

ュベーションした。生理食塩水でビーズを3回洗浄後、ビーズの放射能を測定した。

予め作成した標準曲線より被検血清中のα2-6シアリルトランスフェラーゼ活性を求めた。

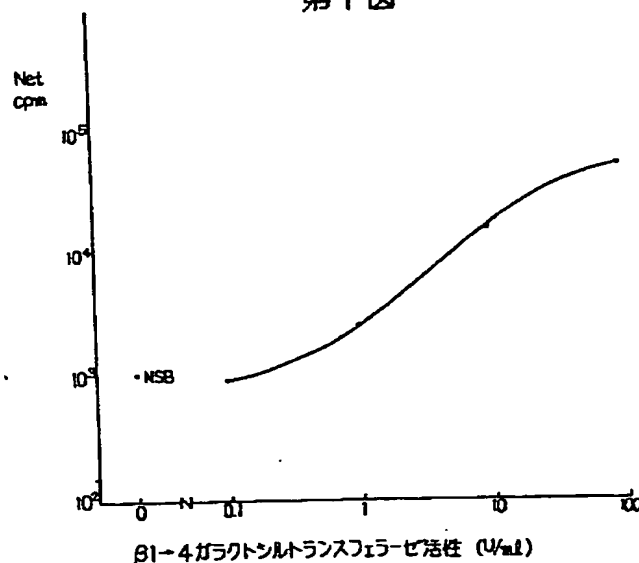
### 4. [図面の簡単な説明]

図1は、本発明により血中のβ1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を測定する場合の標準曲線の一例である。

図2は、本発明により測定した健康者および各種疾患患者の血中β1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の測定値である。

特許出願人 ダイナボット株式会社  
代理人 弁理士 斉藤武彦  
同 弁理士 川瀬良治

第1図





## 第2図

疾患名	陽性率(%)	$\beta$ 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性 ( $\mu$ U/ml)				
		0	25	50	75	100
健康人	1/20 (5.0)	●●●●●●●●●●	●			
肝癌	8/12 (67.7)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●	
胃癌	4/15 (26.7)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●	
大腸癌	1/12 (8.3)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●	
脾癌	5/10 (50.0)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●●●●●	
肺癌	4/9 (44.4)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●●●●●	
卵巣癌	2/5 (50.0)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●●●●●	
子宮癌	1/4 (25.0)	●●●●●	●●●●●	●●●●●	●●●●●	

## 手続補正書

昭和63年12月6日

特許庁長官 吉田文毅殿

## 1. 事件の表示

昭和63年特許願第88257号

## 2. 発明の名称

癌転移酵素活性の免疫学的測定方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ダイナボット株式会社

## 4. 代理人

107  
住所 東京都港区赤坂1丁目1番18号  
赤坂大成ビル(電話582-7161)

氏名 弁理士 (7175) 齊藤武彦

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の例

## 6. 補正の内容

(1) 明細書8頁2行と3行の間に次の文を挿入する。

「予め作成した標準曲線より被検血清中の $\beta$ 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を求めた。

実施例2  $\alpha$ 2-6シアリルトランスフェラーゼ活性の測定

被検血清10 $\mu$ lにパラグロボシド吸着ビーズ(2 $\mu$ g/ビーズ)1個、CMP-NeuAc(シチジン5'-モノフォスフェイトN-アセチルノイラミン酸)液100 $\mu$ l及び1mMカコシル酸ナトリウム緩衝液(pH6.5, Triton X(0.5%)を含む)90 $\mu$ lを加え、37℃で1時間インキュベーションした。生理食塩水でビーズを2回洗浄後、<sup>125</sup>I 標識抗 $\alpha$ 2-6シアリルパラグロボシドモノクローナル抗体液200 $\mu$ lを加え、室温で振盪しながら4時間インキュベーションした。生理食塩水でビーズを3回洗浄後、ビーズの放射能を測定した。」

## 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

手続補正書

平成2年1月17日

昭和 63 年特許願第 88257 号 (特開平  
1-260364 号, 平成 1 年 10 月 17 日  
発行 公開特許公報 1-2604 号掲載) につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 6 ( 1 )

Int. Cl. <sup>5</sup>	識別 記号	庁内整理番号
GOIN 33/573 33/577		A-7906-2G B-7906-2G

特許庁長官 吉田文毅殿

## 1. 事件の表示

昭和63年特許願第88257号

## 2. 発明の名称

糖転移酵素活性の免疫学的測定方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ダイナボット株式会社

## 4. 代理人

107

住所 東京都港区赤坂1丁目1番18号  
赤坂大成ビル (電話 582-7161)

氏名 弁理士 (6323) 川瀬良治



## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書第7頁下から2行の「α2-6シリアル」を削除する。

特許庁